

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590779

研究課題名（和文）C型慢性肝疾患での肝発癌と細胞外マトリックス分解系の遺伝子多型との関連

研究課題名（英文）The association of extracellular matrix metabolism-related gene polymorphisms with hepatic fibrosis progression and hepatocarcinogenesis in HCV chronic liver disease.

研究代表者

村脇 義和（MURAWAKI YOSHIKAZU）

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：90144659

研究成果の概要（和文）：C 型慢性肝炎では肝線維化進行と共に肝発癌率が高くなり、肝硬変では年率7%と高い。肝細胞癌は線維肝に発症するので、発癌後に発育するには周囲の結合織を融解する必要があり、この過程に細胞外マトリックス分解酵素が強く関与している。本研究では、細胞外マトリックス分解酵素、その特異的阻害因子、関連サイトカインの機能的遺伝子多型を解析し、C 型慢性肝疾患での肝線維化・肝発癌・肝細胞癌予後との関連を検討した。

研究成果の概要（英文）：In chronic hepatitis C, the risk of developing hepatocellular carcinoma increases with the progression of liver fibrosis, especially higher in cirrhosis. It is necessary to degrade the surrounding fibrosis matrix of tumor for growth, invasion, and metastasis of malignant tumors, in which matrix metalloproteinases are strongly involved. Recently, functional gene polymorphisms have been identified in matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and fibrosis-related cytokines. In this study, we analyzed these functional gene polymorphisms as the host genetic factors, and examined the association of these polymorphisms with the severity of liver fibrosis and the prognosis of hepatocellular carcinoma in chronic liver diseases C.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学，消化器内科学

キーワード：遺伝子多型、C型肝炎、肝線維化、肝発癌、肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

C 型慢性肝疾患では肝線維化の進行とともに肝発癌率が高くなり、肝硬変では年率7～8%と非

常に高いことが知られている(Gut 53: 425, 2004, Ann Intern Med 142: 105, 2005)。ただ、肝線維化と肝発癌との関連メカニズムについては明らか

でない。肝細胞癌は線維肝・硬変肝に発症するので、発癌後に発育成長するには周囲の結合組織を融解する必要があり、この過程に細胞外マトリックス分解酵素が強く関与している。最近、細胞外マトリックス分解酵素(MMP)、その特異的阻害因子(TIM P)、マトリックス代謝関連サイトカインに機能的遺伝子多型の存在が明らかになり、これら宿主側因子と疾患の進行・重症度との関連が明らかになってきている。本研究では C 型慢性肝疾患でこれら遺伝子多型と肝線維化進展、肝発癌、肝細胞癌の予後との関連を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では C 型慢性肝疾患での肝線維化進行および肝細胞癌の予後に宿主側因子が関与していないか、細胞外マトリックス分解酵素(MMP)、特異的阻害因子(TIM P)、マトリックス代謝関連サイトカインの機能的遺伝子多型を解析し、肝線維化・肝細胞癌予後との関連を検討する。具体的には、C 型慢性肝炎・肝硬変を対象にして、マトリックス分解酵素(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9)、マトリックス分解酵素阻害因子(TIM P-1、TIM P-2)、マトリックス代謝関連サイトカイン(TGF- β 1、CTGF、IL-1 β 、IL-10)の機能的遺伝子多型を解析し、肝線維化進行度・肝発癌予後との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

同意を得た C 型慢性肝疾患症例の末梢血白血球より DnaQuick (大日本製薬)を用いてゲノム DNA を分離抽出し凍結保存する。

平成 20 年度は、MMP-7 -181 A/G の機能的遺伝子多型を Ghilardi らの方法(Clin Chem 49: 1940, 2003)解析し、肝線維化進展および肝発癌との関連を検討した

平成 21 年度は、肝細胞癌で細胞外マトリックス代謝関連酵素: MMP-1 -1607 1G/2G (Matrix Biol 19: 175,2000)、MMP-2 -1306 C/T (Cancer Res 62: 6430, 2002)、MMP-3 -1171 5A/6A (Gastroenterology 121: 124,2001)、MMP-7 -181 A/G (Clin Chem 49: 1940, 2003)、MMP-9 -1562 C/T (Circulation 99: 1788, 1999)およびサイトカイン:IL-1 β -31 T/C (Hepatology 37: 65, 2003)、IL-1RN VNTR(Hepatology 37: 65, 2003)、TGF- β 1 +869 T/C (J Immunol Meth 234: 117,

2000)の機能的遺伝子多型を解析し、臨床病理学的所見と予後との関連を検討した。

平成 22 年度は、炎症性サイトカイン IL-10 の -1087 A/G と -824 T/C (J Gastroenterol Hepatol 22: 1443, 2007)の機能的遺伝子多型を 184 例の C 型慢性肝疾患で解析した

平成 23 年度は、細胞外マトリックス分解酵素の生物学的活性を調整している TIM P-1 の 372 T/C (Stroke 34: 2817, 2003)、TIM P-2 の -418 G/C (Eur Respir J 18: 748, 2001)の機能的遺伝子多型を解析し、肝線維化進展および肝発癌との関連を検討した。加えて、CTGF -945 C/G (J Med Genet 47: 768, 2010)の遺伝子多型を解析した。

4. 研究成果

平成 20 年度は、MMP-7 -181 A/G の機能的遺伝子多型と肝線維化進展および肝発癌との関連を検討したが、肝線維化、肝発癌のいずれとの明らかな関連が認められなかった。具体的には、MMP-7 遺伝子多型を慢性肝炎と肝硬変で比較すると、慢性肝炎では A ホモ型 85%、ヘテロ型 14%、G ホモ型 1%、肝硬変ではそれぞれ 85%、15%、0%であり、両群間で差が無かった(p=0.97)。肝細胞癌発生の有無で検討すると、非肝癌群で A ホモ型 88%、ヘテロ型 11%、G ホモ型 1%、肝癌発生群でそれぞれ 82%、18%、0%であり、両群間で差を認めなかった(p=0.46)。更に肝発癌に関して、背景肝の線維化の程度による影響を除外するために、慢性肝炎群、肝硬変群のなかで検討したが、いずれの群で MMP-7 遺伝子多型と明らかな関連を認めなかった。

平成 21 年度は、肝細胞癌で細胞外マトリックス代謝関連酵素(MMP-1 -1607 1G/2G、MMP-2 -1306 C/T、MMP-3 -1171 5A/6A、MMP-7 -181 A/G、MMP-9 -1562 C/T)およびサイトカイン(IL-1 β -31 T/C、IL-1RN VNTR、TGF- β 1 +869 T/C)の機能的遺伝子多型を解析し、臨床病理学的所見と予後との関連を検討した。その結果、TGF- β 1 +869 C キャリアと MMP-3 5A キャリアで診断時肝細胞癌サイズが有意に大きいことが明らかにされたが、他の臨床病理学的所見に関しては明らかな遺伝子多型頻度に差を認めなかった。各遺伝子多型別での肝細胞癌初発後の生存期間について Kaplan-Meier 法で解

析すると、IL-1 β と MMP-3 において、高転写活性群である IL-1 β T ホモ型、MMP-3 5A キャリアで、肝細胞癌の予後が明らかに不良であることが示された。また、これら遺伝子多型を組み合わせると、IL-1 β -31 T ホモかつ MMP-3 5A キャリアでその予後は著明に不良であった。

平成 22 年度は、炎症性サイトカイン IL-10 の -1087 A/G と -824 T/C の機能的遺伝子多型を 184 例の C 型慢性肝炎患者で解析した。その結果、慢性肝炎と肝硬変の間で多型頻度に差を認めなかったが、肝硬変患者では転写活性の低い -1087 A ホモ型、-824 T ホモ型で肝実質障害が強いことが明らかにされた。また、細胞外マトリックス分解酵素の生物学的活性を調整している TIMP-2 の -418 G/C の機能的多型の解析では、C 型慢性肝炎と肝硬変で多型頻度に明らかな差を認めなかったが、肝硬変患者では転写活性の高い -418 ホモ型で肝硬変自体の病変の進行が強いことが示された。なお、肝線維化進行速度別では多型頻度に差を認めなかった。

平成 23 年度は、細胞外マトリックス分解酵素の生物学的活性を調整している TIMP-1 の 372 T/C、TIMP-2 の -418 G/C の機能的遺伝子多型を PCR 法で 188 例の C 型慢性肝炎患者（慢性肝炎 95 例、肝硬変 93 例）で解析した。TIMP-1 多型は X 染色体 (Xp11) にあり、T アリルで転写活性が低い。TIMP-2 多型は 17 染色体 (17q25) にあり、G アリルで転写活性が高い。慢性肝炎と肝硬変での多型頻度を比較すると、TIMP-1 および TIMP-2 とも両群で多型頻度に明らかな差を認めなかった。慢性肝炎患者を 5 年間の経過観察で肝線維化速度を進行群と不変群に分けて検討すると、TIMP-1 372T/C 多型では差を認めなかったが、TIMP-2 -418G/C 多型では G ホモ型で C アリルキャリアに比べて肝線維化速度が速いことが示された。肝硬変患者で肝実質機能検査との関連を検討すると、TIMP-1 では関連を認めなかったが、TIMP-2 では転写活性の高い G ホモ型で肝硬変自体の病変進行が強いことが示された。加えて TGF- β 1 の調節の下で線維化を促進しているサイトカイン CTGF の -945 G/C 遺伝子多型を 190 例 C 型慢性肝炎患者 (96 例慢性肝炎、94 例肝硬変) を解析した。CTGF-945 G/C 多型では C アリルで転写活性が低い。慢性肝炎と肝硬変で多

型頻度を比較すると、CTGF の転写活性が低い C アリルキャリアが肝硬変 (81%) で慢性肝臓 (69%) に比べて、有意に多いことが示された。慢性肝炎での検討でも、C ホモで肝線維化の進展速度が速い傾向が認められた。肝硬変で肝実質機能検査との関連を検討すると、C ホモで肝実質機能が低下していることが示された。これらの結果は CTGF の生物学的作用を考えると、転写活性の低い群で肝線維化、肝病変の進展が速いことが示されており、現在の機序を検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

① Ishida C, Ikebuchi Y, Okamoto K, Murawaki Y: Functional gene polymorphisms of interleukin-10 are associated with liver disease progression in Japanese patients with hepatitis C virus infection. *Inter Med* 50: 659-666, 2011 査読有

② Okamoto K, Ishida C, Ikebuchi Y, Mandai M, Mimura K, Murawaki Y, Yuasa I.: The genotypes of IL-1 beta and MMP-3 are associated with the prognosis of HCV-related hepatocellular carcinoma. *Inter Med* 49: 887-895, 2010 査読有

③池淵雄一郎、石田千尋、岡本欣也、村脇義和: TIMP-2 遺伝子多型と肝線維化進行. *薬理と治療* 38: s143-s145, 2010 査読無

④岡本欣也、石田千尋、池淵雄一郎、万代真理、三村憲一、村脇義和: サイトカインおよび MMP の遺伝子多型と HCV 関連肝細胞癌との関連. *薬理と治療* 37: s129-s136, 2009 査読無

⑤石田千尋、池淵雄一郎、岡本欣也、村脇義和: Interleukin-10 遺伝子多型と肝線維化進行. *薬理と治療* 37: s89-s92, 2009 査読無

⑥前田直人、大谷英之、万代真理、岡本欣也、村脇義和: 肝線維化および肝発癌と MMP-7 遺伝子多型との関連. *薬理と治療* 36: s173-s176, 2008 査読無

[学会発表] (計9件)

①池淵雄一郎、石田千尋、岡本欣也、村脇義

和:C型慢性肝疾患におけるTIMP-2遺伝子多型と肝線維化進行との関連.第47回日本肝臓学会総会、東京、2011年6月3日

②Ikebuchi Y, Ishida C, Okamoto K, Murawaki Y:The association of TIMP-1 and TIMP-2 gene polymorphisms with the fibrosis progression in chronic liver disease C. EASL 2011, Berlin, March 31, 2011

③池淵雄一郎、石田千尋、岡本欣也、村脇義和:C型慢性肝炎における肝線維化進行とTIMP-2遺伝子多型との関連.第46回日本肝臓学会総会、山形、2010年5月27日

④岡本欣也、石田千尋、池淵雄一郎、村脇義和:IL-10およびTIMP-2遺伝子多型とHCV関連肝細胞癌との関連.第96回日本消化器病学会総会、新潟、2010年4月23日

⑤ Ishida C, Ikebuchi Y, Okamoto K, Murawaki Y:Association of functional gene polymorphisms of Interleukin-10 with the progression of liver fibrosis in Japanese patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. EASL 2010, Vienna, Apr 16, 2010

⑥ Okamoto K, Ikebuchi Y, Ishida C, Murawaki Y.:The association of IL-10 and TIMP-2 gene polymorphisms with HCC carcinogenesis and the prognosis in chronic hepatitis C patients. EASL 2010, Vienna, Apr 16, 2010

⑦石田千尋、池淵雄一郎、岡本欣也、村脇義和:C型慢性肝炎での肝線維化進行Interleukin-10遺伝子多型との関連.第45階日本肝臓学会総会、神戸、2009年6月4日

⑧岡本欣也、石田千尋、池淵雄一郎、大谷英之、万代真理、三村憲一、前田直人、村脇義和:IL-1 β 、IL-1R RN、TGF- β 1、MMP-1、-2、-3、-7、-9の遺伝子多型とHCV関連肝細胞癌との関連.第45階日本肝臓学会総会、神戸、2009年6月4日

⑨Okamoto K, Manadai M, Ootani H, Mimura K, Maeda N, Murawaki Y: The genotypes of interleukin 1 beta, transforming growth factor beta 1 and matrix metalloproteinase 3 are associated with the prognosis of HCV related hepatocellular carcinoma patients. 16th UEGW, Vienna, Oct 21, 2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

村脇 義和(MURAWAKI YOSHIKAZU)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号:90144659